ฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนของสารสกัดจากชุมเห็ดเล็ก (*Senna occidentalis* (L.) Link) ในหนูตัดรังไข่โดยวิธี Vaginal Cornification Assay

Estrogenic Activity of Coffee Senna (*Senna occidentalis* (L.) Link) Extracts in Ovariectomized Rats Using Vaginal Cornification Assay

นิพนธ์ต้นฉบับ

Original Article

วิลาวัณย์ พร้อมพรม*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม

* **ติดต่อผู้นิพนธ์:** Wilawan.pp@msu.ac.th

วารสารไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2556;8(3):98-103

Wilawan Promprom*

Department of Biology, Faculty of Science, Mahasarakham University, Kantharawichai District, MahaSarakham 44150, Thailand

* **Corresponding author:** Wilawan.pp@msu.ac.th

Thai Pharmaceutical and Health Science Journal 2013;8(3):98-103

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์: เพื่อศึกษาฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนของสารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลจากใบชุมเห็ดเล็ก (*Senna occidentalis*(L.) Link) ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื้อเยื่อผิวช่องคลอดและระดับฮอร์โมนของหนูตัดรังไข่ **วิธีการศึกษา:** ใช้หนูสายพันธุ์ Sprague Dawleyจำนวน 24 ตัว น้ำหนัก 200 - 250 กรัม ที่ถูกตัดรังไข่ (ovariectomized) ได้รับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน คือ 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 14 วัน ทำการป้ายเนื้อเยื่อผิวช่องคลอด (Vagina smear) บนสไลด์แล้วศึกษาชนิดของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ **ผลการศึกษา:** สารสกัดของใบชุมเห็ดเล็กที่ความเข้มข้นทั้งสองความเข้มข้นสามารถกระตุ้นเพิ่มจำนวนเซลล์คอร์นิฟายด์ได้ หลังจากหนูตัดรังไข่ได้รับสารสกัดเป็นระยะเวลาตั้งแต่วันที่ 7 และ 8 ตามลำดับ และหนูที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 500 มก./กก. น้ำหนักตัว มีแนวโน้มเพิ่มระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล **สรุป:** สารสกัดจากชุมเห็ดเล็กแสดงฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนได้ในหนูตัดรังไข่ได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าอาจใช้ช่วยรักษาอาการผู้หญิงวัยหมดประจำเดือนได้

คำสำคัญ: *Senna occidentalis* (L.) Link, เอสโตรเจน, เซลล์เนื้อเยื่อผิวช่องคลอด, หนูตัดรังไข่

Abstract

Objective: To study estrogenic activities of ethanolic extracts of Coffee Senna (*Sennaoccidentalis*L. Link) leaves on vaginal cornification assay and hormone levels of ovariectomized rats. **Method:** Twenty-four ovariectomized Sprague Dawley rats, weighting 200 - 250 g were administered with *S. occodentalis* extracts at the different doses (250 and 500 mg/kg body weight). These ovariectomized rats were treated for 14 days. The vaginal smears were spread on a glass slide and studied using the light microscope. **Results:** The extracts of Coffee Senna at the doses of 250 and 500 mg/kg body weight could induce an increase in cornified cells in the 7th and 8th days, respectively. In ovariectomized rats receiving *S. occidentalis* leaves extract at the dose of 500 mg/kg body weight, their estradiol levels were more likely to increase. **Conclusion:** The *S. occidentalis*leaves extract exhibits estrogenic activity in ovariectomized rats, suggesting a possible therapeutic effect for postmenopausal symptoms.

Keywords: *Senna occidentalis* (L.) Link, estrogen, vaginal cornification, ovariectomized rats

บทนำ

ปัจจุบันมีความสนใจและค้นหาการรักษาแบบแพทย์ทางเลือกและทางเสริม (alternative and complementary medicine therapy) มากขึ้น ไม่เว้นแม้การดูแลรักษาความผิดปกติในหญิงวัยหมดประจำเดือน (postmenopausal women) โดยส่วนหนึ่งมีการใช้สารประกอบจากธรรมชาติที่มีโครงสร้าง คุณสมบัติ และกลไกการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ที่เรียกว่าไฟโตเอสโตรเจน (phyto-estrogen) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีจัดอยู่ในกลุ่ม isoflavones, coumestans และ lignans[1] ซึ่งนำมาทดแทนเอสโตรเจนสังเคราะห์ (estrogen replacement therapy หรือ ERT) ในการรักษาหรือป้องกันโรคความผิดปกติในภาวะผู้หญิงวัยหลังหมดประจำเดือน เช่น อาการร้อนวูบวาบ โรคหัวใจและหลอดเลือด โรคกระดูกพรุน เป็นต้น จากการศึกษาวิจัยในปัจจุบันพบว่า การรักษาแบบ ERT เป็นระยะเวลานานติดต่อกันประมาณ 5 - 10 ปีขึ้นไปจะส่งผลทำให้มีอัตราเสี่ยงสูงต่อของการเกิดมะเร็งเต้านม มะเร็งมดลูก และมะเร็งรังไข่[2] ด้วยเหตุนี้ ในปี พ.ศ. 2545 ทางองค์กร Women's Health Initiative (WHI) ในประเทศสหรัฐอเมริกาจึงได้ประกาศยกเลิกใช้เอสโตรเจนสังเคราะห์ทดแทนให้กับผู้ป่วยเป็นระยะเวลานาน[3] นอกจากนี้ ไฟโตเอสโตรเจนที่ได้รับความสนใจเนื่องจากไฟโตเอสโตรเจนออกฤทธิ์ได้ทั้งเสริมและต้านเอสโตรเจน ในกรณีที่มีเอสโตรเจนในร่างกายมากเกินไป ไฟโตเอสโตรเจนจะไปจับกับตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor) เกิดการยับยั้งการทำงานและต้านการออกฤทธิ์ของเอสโตเจน (anti-estrogenic effect) แต่หากร่างกายเกิดการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน เช่น ในหญิงวัยหมดประจำเดือน ไฟโตเอสโตรเจนจะจับกับตัวรับของเอสโตรเจนและออกฤทธิ์เหมือนฮอร์โมนเอสโตรเจน[4] จึงเชื่อว่าไฟโตเอสโตรเจนช่วยลดอาการหลังหมดประจำเดือน มีรายงานการใช้สมุนไพรที่มีไฟโตเอสโตรเจนนั้นอยู่หลายชนิด และที่มีการนำมาใช้อย่างกว้างขวางในต่างประเทศเพื่อใช้เป็นฮอร์โมนทดแทนในสตรีวัยหมดประจำเดือน เช่น สารสกัดจากถั่วเหลือง (*Glycine max*)[5] กวาวเครือขาว (*Puerariamirifica*)[6] ถั่วแขก (*Phaseolus*

vulgaris L.) ถั่วอัลฟัลฟา (*Medicago sativa* L.) ถั่วเขียว (*Vigna radiate* L.) กวาวเครือ (*Puerarialobata* L.) และ red clover (*Trifolium pretense* L.) ซึ่งไฟโตเอสโตรเจนเหล่านี้ พบได้จากพืชผัก ผลไม้ และส่วนใหญ่มักเป็นถั่วหรือพืชตระกูลถั่ว[7]

การศึกษาครั้งนี้จึงใช้พืชสมุนไพรชุมเห็ดเล็ก (*Senna occidentalis* (L.) Link; Coffee Senna) ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ถั่วหรือ Leguminosae-Caesalpiniodeae เป็นไม้ล้มลุกหรือไม้กึ่งพุ่มสูง 60 - 100 เซนติเมตร พบในที่รกร้างว่างเปล่าทั่วไป สารเคมีที่สำคัญที่พบในชุมเห็ดเล็กได้แก่ tanins, saponins, cardiac glycoside, terpenoids, anthraquinones[8] และ achrosin, emodin, anthraquinones, anthrones, apigenin, aurantiobtusin, campesterol, cassiollin, chryso-obtusin, chrysophanic acid, chrysarobin, chrysarobin, chrysophanol, chrysoeriol[9] ส่วนด้านสรรพคุณของชุมเห็ดเล็กในภูมิปัญญาพื้นบ้านนั้น มีการใช้ส่วนราก ใบ และลำต้น ในการรักษาเป็นยาระบาย ขับปัสสาวะ ป้องกันตับอักเสบ ยาขับพยาธิ วัณโรค โรคหนองใน แก้ปวดประจำเดือนหรือประจำเดือนผิดปกติ และโรคโลหิตจาง[10] นอกจากนั้น ยังมีผลงานวิจัยและหลักฐานยืนยันทางวิทยาศาสตร์ว่ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ต้านเชื้อมาลาเรีย[11] ฤทธิ์ในการแก้ปวด และลดไข้[12] แต่ก็ยังขาดหลักฐานหรือผลการทดลองทางวิทยาศาสตร์ของการใช้พืชสมุนไพรชุมเห็ดเล็กต่อระบบสืบพันธุ์ โดยเฉพาะการรับประทานในผู้หญิงหลังวัยหมดประจำเดือน ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื้อเยื่อผิวช่องคลอดและระดับฮอร์โมนในหนูขาวเพศเมียวัยเจริญพันธุ์ที่ตัดรังไข่เป็นโมเดลของผู้หญิงวัยหมดประจำเดือน[13] ซึ่งความรู้ที่ได้อาจเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ในอนาคตทางด้านการแพทย์ทางเลือก เพื่อรักษาและป้องกันอาการความผิดปกติที่เกิดขึ้นอันเนื่องจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน

วิธีการศึกษา

การเตรียมสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็ก

ตัวอย่างพรรณไม้ชุมเห็ดเล็กในการวิจัยครั้งนี้ เก็บจากอุทยานแห่งชาติภูลังกา จังหวัดนครพนมในช่วงเดือนมีนาคม ทำการระบุชนิดพืชพร้อมทั้งศึกษาเปรียบเทียบจากตัวอย่างพรรณไม้อ้างอิง W. Chatan317 (BCU) และK. Larsen 34186 (BKF) ขั้นตอนการสกัดสารจากพืชทำโดยนำใบชุมเห็ดเล็กล้างทำความสะอาดเอาเศษดินออกให้หมด หั่นให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วอบให้แห้งเพื่อป้องกันการเกิดเชื้อรา เมื่อพืชแห้งสนิทแล้วจึงนำมาปั่นบดให้เป็นผง นำผงดังกล่าวไปหมักในอัตราส่วน 1:4 (น้ำหนัก:ปริมาตร) โดยใช้เอทธานอล 95% เป็นตัวทำละลาย หมักเป็นระยะเวลา 7 วันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสและเขย่าเป็นครั้งคราว จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเข้ากระบวนการกลั่นแบบ reflux เพื่อแยกตัวทำละลายที่ผสมอยู่ให้หมดด้วยเครื่อง Rotary evaporator กระบวนการสุดท้าย คือ การทำให้สารสกัดแห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer และเก็บรักษาสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สารสกัดที่ได้มีลักษณะเหนียวข้น และได้ค่า % yield ของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กมีค่าเท่ากับ 19 เปอร์เซ็นต์

การเตรียมสัตว์ทดลอง

เตรียมหนูขาวสายพันธุ์ Sprague Dawley เพศเมียน้ำหนัก 200 - 250 กรัม อายุหนูทดลอง 8 สัปดาห์ ซึ่งได้จากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เลี้ยงหนูทดลองที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 50 เปอร์เซ็นต์ แสงสว่าง 12 ชั่วโมง และให้กินอาหารและน้ำอย่างเพียงพอตามที่ต้องการ (ad libitum) โดยเลี้ยงจำนวน 2 ตัวต่อกรงในสภาพที่เหมือนกันทั้งหมดทุกกลุ่มการทดลอง วิธีการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองได้ความเห็นชอบจากคณะกรรมการกำกับดูแลการใช้สัตว์ เพื่อการศึกษาวิจัย มหาวิทยาลัยมหาสารคาม (เลขที่ 0004/2555) ผ่าตัดเพื่อเอารังไข่ออกทั้ง 2 ข้าง โดยกระทำภายหลังจากการทำให้หนูสลบด้วยยาเพนโทบาร์บิทอลโซเดียม (pentobarbital sodium) และหลังผ่าตัด 14 วันแล้วนำหนูมาป้อนสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็ก

การศึกษาผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ช่องคลอด

การศึกษาฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนต่อเซลล์เยื่อผิวช่องคลอดหนู โดยวิธี vaginal cornification assay ทำการทดสอบโดยแบ่งหนูตัดรังไข่แล้วออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว มาป้อนสารละลายดังนี้

กลุ่มที่ 1 ป้อนสารละลาย 1% Tween 80 ปริมาตร 1 มล./กก. ต่อวัน

กลุ่มที่ 2 ป้อนสารละลาย17α-ethynyl-estradiol ความเข้มข้น 0.1 มก./กก. ต่อวัน ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 ป้อนสารละลายสารสกัดใบชุมเห็ดเล็กความเข้มข้น 250 มก./กก. ต่อวัน ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 4 ป้อนสารละลายสารสกัดใบชุมเห็ดเล็กความเข้มข้น 500 มก./กก. ต่อวัน ในปริมาตร 1 มิลลิลิตร

การวิเคราะห์เซลล์ช่องคลอดใช้ระยะเวลาในการทดลองทั้งหมด 14 วัน และทำการสเมียร์ช่องคลอดทุกวัน เก็บตัวอย่างเซลล์ช่องคลอดในช่วงเช้าเริ่มตั้งแต่เวลา 9.00 - 10.00 น. โดยสอดทิป (tip) ที่บรรจุสารละลายซาลีนบัฟเฟอร์ (saline buffer) เข้าไปในช่องคลอดแล้วดูดเข้า-ออก นำของเหลวที่ได้ไปหยดลงบนแผ่นสไลด์และย้อมสีด้วยเมธีลีนบลู (methylene blue) นำสไลด์ไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อแยกประเภทของเซลล์ โดยในช่องคลอดสามารถพบเซลล์ได้ 3 ชนิด คือ (O; Nucleated cell, L; Leucocyte cell และ Co; Cornifified cell) ในการทดลองครั้งนี้ใช้

เซลล์คอร์นิฟายด์ (cornified cells) เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของเอสโตเจน (estrogenic activity)[14,15]

วิธีเตรียมสารละลายของ 17α-ethynylestradiol โดยละลายใน ethanol เล็กน้อยก่อนนำไปละลายใน 1% Tween 80 ส่วนการเตรียมสารละลายของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็ก ให้ละลายใน 1% Tween 80 เตรียมสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน

การศึกษาผลของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กต่อระดับฮอร์โมน

การตรวจวัดระดับฮอร์โมนในเลือด โดยเก็บเลือดออกจากหัวใจ (Cardiae puncture)ภายหลังจากการเก็บเลือดจากหัวใจแล้ว นำเลือดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที เพื่อแยกเม็ดเลือดแดงและ serum ออกจากกันและเก็บ serum ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวัดระดับฮอร์โมน โดยจะทำการตรวจวัดระดับของ Estradiol (E2) และ Luteinizing hormone (LH) โดยใช้หลักการ Direct Chemiluminesent Technology ด้วยเครื่อง ADVIA Centaur CP (UK.)

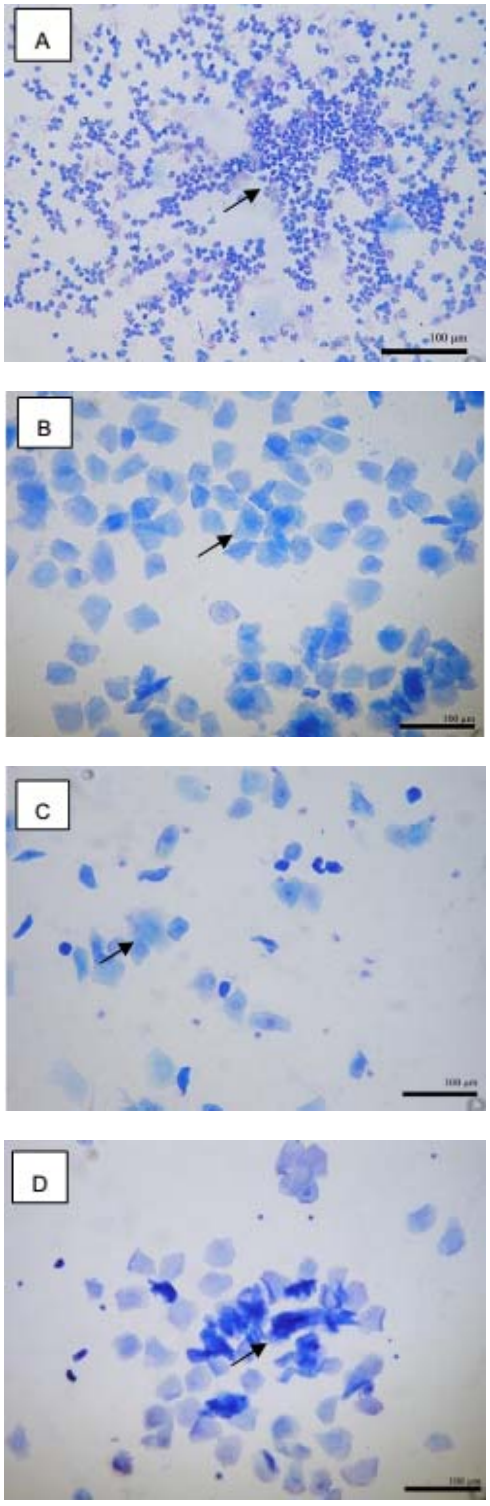
การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ค่าเฉลี่ย (Mean) และ Standard error of means (SEM) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มการทดลองวิเคราะห์โดย one-way ANOVA และใช้ post hoc Duncan's New Multiple Range Testที่ระดับความเชื่อมั่น $P < 0.05$

ผลการศึกษา

ผลของสารสกัดชุมเห็ดเล็กต่อเซลล์เนื้อเยื่อผิวช่องคลอด

ผลการทดสอบฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนของสารสกัดจากชุมเห็ดเล็ก พบว่าเมื่อทำการสเมียร์ช่องคลอดหนูตัดรังไข่ของกลุ่มควบคุม จะพบเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) เท่านั้น (รูปที่ 1A) ส่วนหนูตัดรังไข่ที่ได้รับ 17α-ethynylestradiol ทุกตัวสามารถตรวจพบเซลล์คอร์นิฟายด์ ได้ตั้งแต่วันที่ 4 ของการให้ฮอร์โมน ส่วนหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กที่ความเข้มข้น 250 มก./กก. น้ำหนักตัว สามารถพบนิวเคลียสและเซลล์คอร์ฟายด์และพบการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์คอร์นิฟายด์ได้ โดยสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของเซลล์คอร์นิฟายด์ได้ตั้งแต่วันที่ 7 ถึงวันที่ 14 มีเปอร์เซ็นต์อยู่ระหว่าง 16.66 - 33.33% (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1C) ส่วนหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กที่ความเข้มข้น 500 มก./กก. น้ำหนักตัว สามารถพบนิวเคลียสและเซลล์คอร์ฟายด์ และพบการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซนต์คอร์นิฟายด์ได้ โดยสามารถเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของเซลล์คอร์นิฟายด์ได้ตั้งแต่วันที่ 8 ถึงวันที่ 14 มีเปอร์เซ็นต์อยู่ระหว่าง 33.33 - 66.66% (ตารางที่ 1 และรูปที่ 1D)



ภาพที่ 1 ภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์ช่องคลอดของหนูตัดรังไข่ถูกย้อมสีด้วย methylene blue (the bar equals 100 μm) (A) กลุ่มควบคุม (OVX; ลูกศรชี้ leukocytes) (B) ได้รับ 17α-ethinylestradiol (0.1 มก./กก. น้ำหนักตัว; ลูกศรชี้ cornified epithelial) (C) สารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็ก (250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว; ลูกศรชี้ cornified epithelial) (D) สารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็ก (500 มก./กก. น้ำหนักตัว; ลูกศรชี้ cornified epithelial) เป็นระยะเวลา 14 วัน

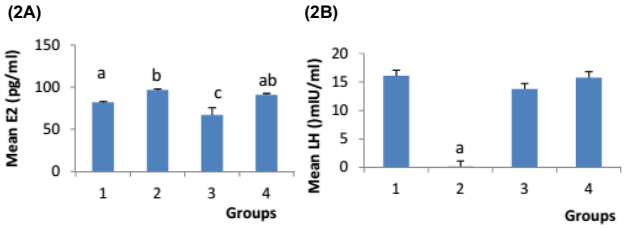
ตารางที่ 1 จำนวนหนูที่พบเซลล์คอร์นิฟายด์ (cornified cells) ในเนื้อเยื่อผิวช่องคลอดหนูตัดรังไข่

กลุ่ม	N	การทดลอง	จำนวนหนูที่พบคอร์นิฟายด์ในเนื้อเยื่อผิวช่องคลอด (%) ที่วันต่าง ๆ													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	6	ป้อนสารละลาย 1 % Tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	6	ป้อนสารละลาย 17α-ethynylestradiol ความเข้มข้น 0.1 มก./กก. น้ำหนักตัว	0	0	0	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
3	6	ป้อนสารละลายสารสกัดใบชุมเห็ดเล็ก ความเข้มข้น 250 มก./กก. น้ำหนักตัว	0	0	0	0	0	0	16.67	16.67	33.33	33.33	33.33	33.33	16.67	33.33
4	9	ป้อนสารละลายสารสกัดใบชุมเห็ดเล็ก ความเข้มข้น 500 มก./กก. น้ำหนักตัว	0	0	0	0	0	0	0	33.33	33.33	50	33.33	33.33	50	66.67

ผลของสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กต่อระดับฮอร์โมน

หนูตัดรังไข่ที่ได้รับ 17α–ethynylestradiol มีระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล (estradiol hormone) เท่ากับ (97.78 ± 1.2 pg/ml) (n = 6) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่ (ovx) ซึ่งมีค่าเท่ากับ (82.20 ± 0.96pg/ml) มีค่าระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กความเข้มข้น 250 มก./กก. น้ำหนักตัว มีระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลเท่ากับ (66.93 ± 8.88 pg/ml) และหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กความเข้มข้น 500 มก./ กก. น้ำหนักตัว มีแนวโน้มเพิ่มระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล (90.99 ± 1.85 pg/ml) (รูปที่ 2A)

ในขณะเดียวกันระดับซีรั่มลูติไนซิงฮอร์โมน (luteinizing hormone; LH) ในหนูตัดรังไข่ที่ได้รับ 17α–ethynylestradiol มีค่าลดลง (0.18 ± 0.7 mIU/ml) มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูตัดรังไข่ (16.07 ± 1.88 mIU/ml) ส่วนหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กความเข้มข้น 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัว มีค่าระดับฮอร์โมน LH ลดลง คือ 13.76 ± 4.42 mIU/ml และ 15.77 ± 2.22 mIU/ml ตามลำดับ (รูปที่ 2B)



รูปที่ 2 ผลของสารสกัด *Senna occidentalis* extract ต่อระดับ ethinylestradiol ในซีรั่ม (serum E_2) (A), ระดับฮอร์โมนลูติไนซิง (B); 1 = Ovariectomized rats; 2 = 17α-ethynyestradiol (0.1 มก./กก. น้ำหนักตัว); 3 = *Sennaoccidentalis* (250 มก./กก. น้ำหนักตัว) 4 = *Sennaoccidentalis* (500 มก./กก. น้ำหนักตัว) (mean ± S.E.M, n = 6)

a,b, c $P < 0.05$ compared with control

อภิปรายและสรุปผลการศึกษา

วงจรการเปลี่ยนแปลงของเยื่อบุช่องคลอด สามารถตรวจพบได้จากการทำ vaginal smear ซึ่งปกติวงจร estrous cycle ในหนูขาวแบ่งได้ 4 ระยะ คือ proestrus, estrus, metestrus และ diestrus โดยรวมทั้ง 4 ระยะใช้เวลา 4 - 5 วัน[16,17] แต่เมื่อเราทำการตัดรังไข่ในหนูจะส่งผลทำให้วงจรการเป็นสัดเกิดการเปลี่ยนแปลง คือ ไม่เกิดระยะการตกไข่ (ovulation) และเนื้อเยื่อช่องคลอดบาง แห้ง และเหี่ยวซึ่งเป็นอิทธิพลมาจากการขาดฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยที่ฮอร์โมนเอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญในการรักษาให้เนื้อเยื่อช่องคลอดมีสุขภาพดี[18,19]

การศึกษาฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจน โดยให้สารสกัดสมุนไพรจากใบชุมเห็ดเล็กต่อเซลล์เนื้อเยื่อผิวช่องคลอดในหนูตัดรังไข่ทดสอบโดยวิธี vaginal cornification assay ที่ระดับความเข้มข้น 250 และ 500 มก./กก. น้ำหนักตัวต่อวัน เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กสามารถกระตุ้นให้เกิดวงรอบการเป็นสัดได้ทั้ง 4 ระยะ และมีการเพิ่มขึ้นของจำนวนเซลล์คอร์นิฟายด์ในช่องคลอดของหนูตัดรังไข่ได้ มีผลในหนูบางตัวเท่านั้น โดยเมื่อคิดเทียบเป็นจำนวนเปอร์เซ็นต์แล้ว หนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กที่ความเข้มข้น 250 มก./กก. น้ำหนักตัวต่อวันมีจำนวนเปอร์เซ็นต์ของเซลล์คอร์นิฟายด์ที่ต่ำกว่า หนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กความเข้มข้น 500 มก./กก. น้ำหนักตัวต่อวัน ที่เป็นเช่นนั้นเพราะว่ามีการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์เนื้อเยื่อผิวช่องคลอดในหนูตัดรังไข่โดยปกติแล้วจะพบว่ามีเซลล์ลิวโคไซต์อยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งแสดงถึงการแฟบหรือการเหี่ยวของผนังช่องคลอด แต่เมื่อหนูตัดรังไข่ได้รับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กทั้งสองความเข้มข้นกลับทำให้สภาพของเซลล์เนื้อเยื่อผิวช่องคลอดเปลี่ยนไปเป็นเซลล์คอร์นิฟายด์ ซึ่งแสดงถึงการเต่งตึงของผนังช่องคลอดและการที่ให้สารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กในปริมาณสูงจะออกฤทธิ์ได้แรงกว่าชุมเห็ดเล็กในปริมาณต่ำแสดงว่าการจับกับตัวรับเอสโตรเจนแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารไฟโตเอสโตรเจนในชุมเห็ดเล็กที่หนูตัดรังไข่ได้รับ ส่วนจำนวนหนูที่พบคอร์นิฟายด์ในเนื้อเยื่อผิวช่องคลอดของหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กที่ความเข้มข้น 250 มก./กก. และหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กความเข้มข้น 500

มก./กก. น้ำหนักตัวต่อวันมีเปอร์เซ็นต์จำนวนลดลงในวันที่ 13 และวันที่ 14 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) นั้น อาจเป็นผลมาจากการสเมียร์ช่องคลอดของแต่ละช่วงเวลาที่ไม่เท่ากัน แต่ในวันดังกล่าวก็ยังคงแสดงจำนวนหนูที่พบคอร์นิฟายด์ในเนื้อเยื่อผิวช่องคลอดอยู่ ดังนั้นการทดสอบในครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กมีผลต่อ estrogenic ในหนูตัดรังไข่ โดยช่วยให้สุขภาพช่องคลอดดีขึ้นซึ่งคล้ายกับผลงานวิจัยของ Parhizkar และคณะ (2011)[14] ที่ศึกษาฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนของสารสกัดจาก *Nigella sativa* สามารถเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เนื้อเยื่อผิวช่องคลอดของหนูตัดรังไข่ ด้วยวิธี vaginal cornification assay ทำให้พบนิวเคลียสและเซลล์คอร์นิฟายด์ ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการแสดงฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจน และผลการศึกษาคล้ายกับผลการทดลองของ Cherdshewasart และคณะ (2007)[6] ที่พบว่ากวาวเครือขาวมีฤทธิ์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เซลล์เนื้อเยื่อผิวช่องคลอดได้ช้าหรือเร็วต่างกัน โดยการได้รับกวาวเครือในปริมาณ 100 มก./กก. น้ำหนักตัวมีผลในหนูบางตัวเท่านั้น แต่เมื่อหนูตัดรังไข่ได้รับกวาวเครือขาวในปริมาณสูงสุด คือ 1,000 มก./กก. น้ำหนักตัว แสดงผลหนูทดลองทุกตัวผลของการวิจัยยังสอดคลองกับการรายงานผลการวิจัยของ Vijayanarayana และคณะ (2007)[20] ที่พบว่าสารสกัดจากรากของว่านพร้าว (*Curculigo orchioides*) สามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มเปอร์เซ็นต์ของเซลล์คอร์นิฟายด์ในหนูตัดรังไข่ได้

นอกจากนั้นการวัดระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล (estradiol; E_2) ก็ใช้เป็นตัวบ่งชี้ของการทำงานของเอสโตรเจนของสารสกัดได้ด้วย[14] จะเห็นได้ว่าเมื่อหนูตัดรังไข่เป็นระยะเวลา 14 วัน มีระดับฮอร์โมน E_2 ต่ำลง และฮอร์โมน LH สูงขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากการที่หนูไม่มีรังไข่สร้างฮอร์โมนเอสโตรเจน การที่ระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งหายไปจากกระแสเลือด จะมีผลไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองหลั่งฮอร์โมน LH ออกมามากขึ้น เมื่อหนูตัดรังไข่ที่ได้รับสารสกัดจากชุมเห็ดเล็กที่ความเข้มข้น 500 มก./กก. น้ำหนักตัวกลับมีแนวโน้มเพิ่มระดับฮอร์โมนเอสตราไดออลได้ในขณะเดียวกันระดับฮอร์โมน LH ในเลือดลดต่ำลง

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบชุมเห็ดเล็กที่ระดับความเข้มข้น 500 มก./กก. น้ำหนักตัว มีแนวโน้มที่จะแสดงฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนได้อย่างอ่อนในการกระตุ้นให้เกิดเซลล์คอร์นิฟายด์ในช่องคลอด และเพิ่มระดับเอสตราไดออลได้ แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจน สามารถศึกษาได้หลายวิธี เช่น การศึกษาฤทธิ์การเป็นเอสโทรเจนิกต่อน้ำหนักมดลูกโดยวิธี uterotrophic assay ดังนั้นเพื่อเป็นการทดสอบให้มีความชัดเจนมากยิ่งขึ้นควรศึกษาฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนต่อน้ำหนักมดลูกหนูโดยวิธี uterotrophic assay หรือการศึกษาฤทธิ์การเป็นเอสโตรเจนในเซลล์มะเร็งเต้านมด้วยเพื่อแสดงการตอบสนองในเซลล์มะเร็ง ในลักษณะที่เหมือนผลของเอสโตรเจนหรือเป็นผลในทางตรงกันข้าม ดังนั้นไฟโตเอสโตรเจนจึงอาจจะลดหรือยับยั้งฤทธิ์ของเอสโตรเจนที่มีต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ตอบสนองต่อเอสโตรเจน เช่น เนื้อเยื่อเต้านม เป็นต้น ซึ่งทำให้ไฟโตเอสโตรเจนช่วยลดความเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งเต้านมได้ก่อนนำมาประยุกต์ใช้ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2554 รหัสแผนงานวิจัย 51593

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.วรรณชัย ชาแท่น มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ช่วยระบุชนิดพืช ขอขอบคุณอาคารสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์สัตว์ทดลอง เครื่องมือ อุปกรณ์ สถานที่ และอุทยานแห่งชาติภูลังกา กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืชที่อนุญาตให้เข้าศึกษาตัวอย่างพันธุ์ไม้ในอุทยานแห่งชาติดังกล่าว

เอกสารอ้างอิง

1. Mazur WM, Duke JA, Wahala K, Rasku S, Adlereutz H. Isoflavonoids and lignans in legumes: Nutritional and health aspects in humans. *J Nutr Biochem* 1998;9:193-200.
2. Wuttke W, Jarry H, Westphalen S, Christoffel V, Seidlova-Wuttke D. Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;83:133-147.
3. Wuttke W, Jarry H, Becker T, et al. Phytoestrogen: endocrine or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* 2008;61: 159-170.
4. Mitchell JH, Cawood E, Kinniburgh D, Provan A, Collins AR, Irvine S. Effect of a phytoestrogen food supplement on reproductive health in normal males. *Clin SCi* 2001;100:613-618.
5. Wagner JD, Cafalu WT, Anthony MS, Litwak KN, Zhang L, Clarkson TB. Dietary soy protein and estrogen replacement therapy improve cardiovascular risk factors and decrease aortic cholesteryl-estervcontent in ovariectomizedcynomolgus monkey. *Metabolism* 1997;46:698-705.
6. Cherdshewasart W, Kitsama Y, Malaivijitnono S. Evaluation of the estrogenic activity of the wild *Puerariamirifica* by vaginal cornification assay. *J Reprod Develop* 2007;53(2):385-393.
7. Bou SM, Wiese TE, Nehls S, et al. Evaluation of the estrogenic effects of Legume extracts containing phytoestrogens. *J Agr Food Chem* 2003;51(8):2193-2199.
8. Sadiq IS, Shuaibu M, Bello AB, et al. Phytochemistry and anti-microbial activities of *Cassia occidentalis*Used for herbal remedies. *J Chem Eng* 2012;1:38-41.
9. Yadav JP, Arya V, Yadav S, PanghalM, Kumar S, Dhankhar S. *Cassia occiddentalis* L.: A review on its ethnobotany, phytochemical and pharmacological profile. *Fitoterapia* 2010;81:223-230.
10. Krithikar KR, Basu BD. *Cassia occidentalis* Indian medicinal plants, II edition. 1999: p.860.

11. Mohammed M, Aboki MA, Saidu HM, Victor O, Tawakalitu A, Maikano SA. Phytochemical and some antimicrobial activity of *Cassia occidentalis* L. (Caesalpiniaceae). *IJST* 2012;2:200-209.
12. Sini K. R, Sinha B. N, Karpakavalli M and Sangeetha P. T. Analgesic and antipyretic activity of *Cassia occidentalis*Linn. *Ann Biol Res* 2011; 2:195-200.
13. Meli R, Pacilio M, Raso G. M, Esposito E., Coppola A, Nasti A. Estrogen and raloxifene modulate leptin and its receptor in hypothalamus and adipose tissue from ovariectomized rats. *Endocrinology* 2004;145:3115-3121.
14. Parhizkar S, Latiff LA, Rahman SA, Aziz D, Parichehr H. Assessing estrogenic activity of *Nigella sativa* in ovariectomized rats using vaginal cornification assay. *Afr J Pharm Pharmacol* 2011; 5(2):137-142.
15. Cherdshewasart W, Sriwatcharakul S, Malaivijitnond S. Variance of estrogenic activity of the phytoestrogen-rich plant. *Maturitas* 2008; 61: 350-357.
16. Circosta C, Sanogo R, Occhiuto F. Effects of *Calotropisprocera*on oestrous cycle and on oestrogenic functionality in rats. *Il Farmaco*. 2001;56:373-378.
17. Arthur KC, Darrold LD. Determining the stage of the estrous cycle in the mouse by the appearance of the vagina. *Biol Reprod 1973*:8:491-494.
18. Rimoldi G, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W. Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina. *Monograph* 2007;115:62-68.
19. Branco CC, Cancelo MJ, Villero J, Nohales F, Julia MD. Management of post-menopausal vaginal atrophy and atrophic vaginitis. *Maturitas* 2005;52:46-52.
20. Vijayanarayana K, Rodrigues RS, Chandrashekhar KS, Subrahmanyam EVS. Evaluation of estrogenic activity of alcoholic extract of rhizomes of *Curculigoorchioides*. *J Ethnopharmacol* 2007; 114:241-245.

Editorial note
Manuscript received in original form on March 12, 2013;
accepted in final form on September 30, 2013